

論文の内容の要旨

論文題目 抗体エフェクター活性の増強と医薬への応用

氏名 夏目 暁人

1. 序論

近年、癌等の疾病領域で、細胞表面の分子をターゲット（抗原）とするモノクローナル抗体が医薬に応用されている。抗体は生体内に存在する蛋白質分子であるが、生体は抗体分子内の一部の領域（可変領域）に後天的に無数のバリエーションを生み出す仕組みを有し、マウスなどを用いて所望の抗原に特異的に結合する抗体を取得可能であるため、適切な抗原の選択により癌細胞特異的に反応する抗体を創出することも可能である。非ヒト動物由来の抗体はヒトにとって高い免疫原性を有するが、遺伝子組換え技術を利用して、抗原結合活性を有する可変領域以外（定常領域）をヒト抗体に置き換えることにより免疫原性を抑えることが可能である。ヒト抗体の定常領域にはいくつかのアイソタイプが存在するが、エフェクター活性が強く血中安定性が高い IgG1 型の定常領域が一般的に選択される（Fig.1）。1990 年代以降、20 以上もの抗体が医薬として承認されており、各種の癌患者において、全生存期間や無増悪期間の延長など治療効果の改善が認められている。

抗体分子は、抗原結合活性を有する可変領域と、可変領域以外の定常領域からなり、最近では、抗体が定常領域（特に Fc 領域）を介して生体内の免疫系を活性化し標的細胞を攻撃する、いわゆる抗体エフェクター活性が抗体医薬の薬効に寄与し得ることが、臨床からの報告により明らかになってきている。中でも、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）や補体依存性細胞

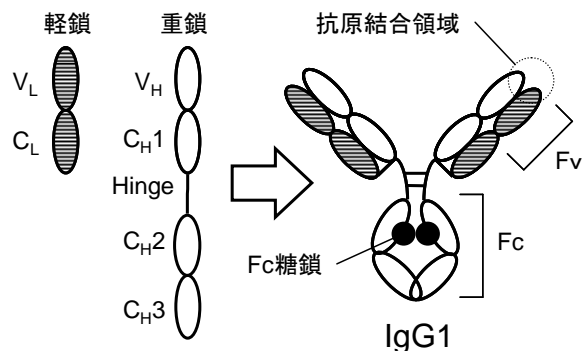


Fig.1 ヒトIgG1抗体の構造

傷害活性（CDC）と抗体薬効の関連を示唆する報告は多い。一方で、薬効不足や高投与量に起因するコスト上昇などが抗体医薬を開発する上で問題となってきたり、エフェクター活性を増強する手法が広く研究されている。ADCC 活性や CDC 活性は、抗原に結合した抗体の定常領域を介して誘導されるため、定常領域のアミノ酸配列や定常領域に付加した N 結合型糖鎖（Fc 糖鎖：Fig.2）を改変することにより増強可能である。しかしながら、多くの抗体で臨床試験が行われエフェクター活性に関する理解が進むにつれて、様々な要因で個々のエフェクター活性が惹起されにくい場合があることも明らかになりつつあり、エフェクター活性増強の重要性がさらに高まってきているが、単独のエフェクター活性の増強に限界があることから、さらなる抗体活性の増強には新たなアプローチが必要である。

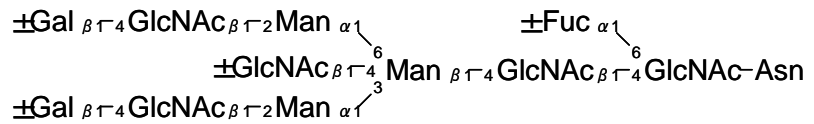


Fig.2 Fc糖鎖の構造

そのようなアプローチの一つとして、異なるエフェクター活性の増強技術を組み合わせることにより、抗体活性を複合的に増強できる可能性が考えられる。ただし、アミノ酸配列の改変により ADCC 活性は増強されたが CDC 活性は低下した例の報告もあり、組み合わせる活性増強技術には、互いの活性に影響しないことが求められる。本研究においては、ADCC 活性と CDC 活性の同時増強による抗体医薬の活性増強の可能性を見極めるため、既存の ADCC 活性増強手法に関して他の手法との組合せ可能性の検討、ADCC 活性増強の手法と組合せ可能な新規 CDC 活性増強手法の創出、ADCC 活性増強と CDC 活性増強の組合せによる抗体医薬の活性増強の検証を行った。

そのようなアプローチの一つとして、異なるエフェクター活性の増強技術を組み合わせることにより、抗体活性を複合的に増強できる可能性が考えられる。ただし、アミノ酸配列の改変により ADCC 活性は増強されたが CDC 活性は低下した例の報告もあり、組み合わせる活性増強技術には、互いの活性に影響しないことが求められる。本研究においては、ADCC 活性と CDC 活性の同時増強による抗体医薬の活性増強の可能性を見極めるため、既存の ADCC 活性増強手法に関して他の手法との組合せ可能性の検討、ADCC 活性増強の手法と組合せ可能な新規 CDC 活性増強手法の創出、ADCC 活性増強と CDC 活性増強の組合せによる抗体医薬の活性増強の検証を行った。

2. 糖鎖修飾制御による ADCC 活性増強手法の応用

Fc 糖鎖中のフコース修飾を欠失したヒト IgG1 抗体が、高い ADCC 活性を示すことが近年明らかとなっており、Fc 糖鎖中のフコース修飾を司る糖転移酵素 α -1,6 fucosyltransferase をコードする遺伝子 *FUT8* をノックアウトした CHO 細胞 (CHO/*FUT8*^{-/-}) を生産宿主としたヒト IgG1 抗体は、Fc 糖鎖中のフコース修飾を完全に欠失しており、フコース修飾された抗体に比べ極めて高い ADCC 活性を有する。この ADCC 活性増強の手法を他の手法と組み合わせてもさらなる ADCC 活性増強は認められず、フコース修飾の欠失により抗体の ADCC 活性はその限界まで増強されていることが報告されている。

本研究においては、この CHO/*FUT8*^{-/-} を宿主としフコース修飾を欠失した抗体を生産する手法について、他のエフェクター活性増強技術との組み合わせの可能性を見出すべく検討を行った。結果として、CHO/*FUT8*^{-/-} を生産宿主とすることにより、ヒト IgG1 抗体の Fc を有する抗体様分子 (scFv-Fc および scFv₂-Fc)、または IgG1 以外のアイソタイプのヒト IgG 抗体 (IgG2、IgG3、IgG4) においても、ヒト IgG1 抗体の場合と同様に、Fc 糖鎖中のフコース修飾を欠失し、ADCC 活性のトリガー分子である FcγRIIIa への結合活性および ADCC 活性が増強された。また、全てのヒト IgG サブクラスにおいて CDC 活性への影響は認められなかった。これらの結果から、CHO/*FUT8*^{-/-} を生産宿主とし ADCC 活性を増強する手法は汎用性が高く、また、特にヒト IgG サブクラスをベースとした CDC 活性増強の手法と組み合わせの相性が良いことが示唆された。

3. ヒト IgG サブクラスを利用した CDC 活性増強手法の創出

ヒト IgG1 抗体の重鎖定常領域において適当なアミノ酸配列改変を行うことにより CDC 活性が強力に増強されることが知られているが、同時に ADCC 活性が低下することも報告されており、また、人工的な配列の導入は免疫原性を高める可能性もあることから、天然のヒト抗体由来の配列を用いて ADCC 活性への影響なく CDC 活性を増強することができれば抗体医薬にとって活性増強の有用な手法となり得る。ヒト IgG 抗体はサブクラスによって活性が異なり、IgG1 は ADCC 活性、IgG3 は CDC 活性に優れることが知られている (Fig.3)。

本研究においては、ヒト IgG1 抗体の高い ADCC 活性とヒト IgG3 抗体の高い CDC 活性を併せ持つような抗体を創出すべく、これらサブクラスを組み合わせた重鎖定常領域 (Fig.4) の最適化を試み、結果として、ヒト IgG1 抗体の重鎖定常領域のうち、C 末端領域を除く Fc をヒト IgG3 抗体のアミノ酸配列に置き換えた重鎖定常領域が、IgG1 と同等の ADCC 活性を維持しつつ、驚くべきことに、IgG1 および IgG3 のいずれをも上回る CDC 活性を示すことを見出した。この重鎖定常領域を用いた抗体は、CDC 活性のトリガー分子である補体第一因子 C1 との結合活性が上昇しており、CDC 活性感受性が低い腫瘍細胞株に対しても CDC 活性を誘導可能であった。また、複数の抗体医薬において本手法による CDC 活性増強が認められた。IgG3 抗体は IgG1 抗体に比べ ADCC 活性が低いが、ドメイン単位での組合せ検討の結果、IgG3 抗体の低い ADCC 活性はそのヒンジに起因し、IgG3 抗体の Fc は ADCC 活性に関して IgG1 抗体の Fc と同等であることが示された。そのため、IgG3 抗体の Fc を用いても IgG1 抗体と同等の ADCC 活性が維持されることが考えられる。

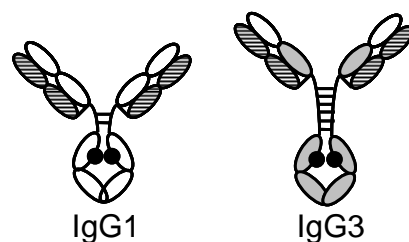


Fig.3 ヒトIgG1/IgG3抗体の構造

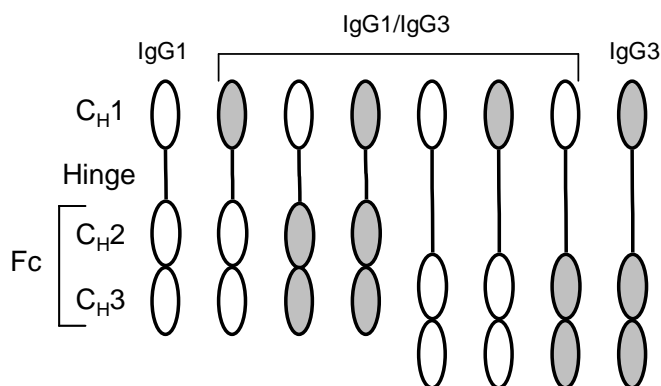


Fig.4 ヒトIgG1/IgG3を組み合わせた重鎖定常領域

4. ADCC 活性と CDC 活性の同時増強

抗 CD20 抗体をモデルとして、本研究において新たに見出されたヒト IgG1/IgG3 抗体組み合わせの重鎖定常領域を用い CDC 活性を増強する手法と、CHO/*FUT8*^{-/-}を生産宿主として Fc 糖鎖中のフコース修飾を欠失させ ADCC 活性を増強する手法とを組み合わせたところ、各活性を単独で増強した場合と同等に両活性を同時に増強可能であることが明らかとなった。また、これらの手法を用いて両活性を同時に増強した抗体は、ヒトおよびサルの中において、各活性を単独で増強した抗体に比べ高い標的細胞除去活性を示し、同時増強による薬効的なメリットが示された。ヒト血液において、ADCC 活性と CDC 活性がともに増強された抗 CD20 抗体は、それぞれエフェクター活性のバランスが異なるいずれのドナーにおいても最大の活性を示したことから、複数のエフェクター活性を増強した抗体が生体内の環境に個人差があるような場合にも、高い抗体活性を維持し得る可能性が示唆された。

5. 総括

本研究においては、抗体のエフェクター活性である ADCC 活性と CDC 活性に着目し、これら活性を同時に増強することにより抗体医薬の活性を増強することを目指して検討を行った。結果として、CHO/*FUT8*^{-/-}を生産宿主として Fc 糖鎖中のフコース修飾を欠失させ ADCC 活性を増強する既存の手法と組合せ可能な CDC 活性増強手法を新たに見出した。本手法は、ヒト IgG1 抗体とヒト IgG3 抗体を組み合わせた重鎖定常領域を用いることによって抗体の CDC 活性を大きく増強するものである。本手法を用いることによる ADCC 活性への影響は認められず、さらに、CHO/*FUT8*^{-/-}を生産宿主とし Fc 糖鎖中のフコース修飾を欠失させることにより、ヒト IgG1 抗体の場合と同等に ADCC 活性を増強可能であった。このようにして ADCC 活性と CDC 活性を増強した抗体は、ヒトおよびサルの血中において、単独の活性を増強した抗体に比べ高い標的細胞除去活性を示し、両活性を増強することによる薬効的なメリットが示された。また、ここで用いた、ADCC 活性または CDC 活性を増強する手法はいずれも、天然に存在する微小な差異が特定の活性にのみ大きく作用することを利用してため免疫原性のリスクが低く、他の抗体にも広く応用可能であった。これらの技術を併用することにより複合的に活性を増強した抗体は、抗体治療における様々な耐性メカニズムを克服し高い薬効を発揮し得るため抗体医薬の新たなプラットフォームとして期待できる。